

## Growth of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit biofertilized with arbuscular mycorrhizal fungi in the nursery

## Crecimiento de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit biofertilizada con hongos micorrízicos arbusculares en vivero

Juan F. Aguirre-Medina\*; Ana L. Gálvez-López; José C. Ibarra-Puón

Universidad Autónoma de Chiapas, Facultad de Ciencias Agrícolas, Campus IV. Entronque Carretera Costera y Estación Huehuetán km 1. C. P. 30660. Huehuetán, Chiapas, México.

\*Corresponding author: juanf56@prodigy.net.mx, tel.: 964 627 0128, fax: 964 627 0439

### Abstract

**Introduction:** *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit is native to tropical America. The root system of the species is associated with microorganisms that improve nutrition and growth.

**Objective:** To evaluate the effect of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) collections on the phosphorus (P) content and growth of *L. leucocephala* in the nursery.

**Materials and methods:** The seeds were sown and six treatments were applied: *Rhizophagus intraradices* (Schenck & Sm.) Walker & Schüßler (1), the collections “Caracoles” (2), “Rosario Izapa” (3), “Té limón” (4) and “San Rafael” (5), fertilization  $15_N-15_P-15_K$  (6) and a control. Morphological and physiological variables, root colonization and P content were recorded at 120 days. Data were subjected to an analysis of variance and Tukey’s range test ( $P \leq 0.05$ ).

**Results and discussion:** AMF improved plant characteristics in comparison with the control and fertilization. *Rhizophagus intraradices* caused the highest growth values in the aerial part, mycorrhizal colonization and P content, and the lowest growth in the root system. The “Caracoles” and “Rosario Izapa” isolates promoted height, root biomass and P content higher than “Té limón” and “San Rafael”.

**Conclusion:** AMF allow decreasing chemical fertilization without detriment to the growth of *L. leucocephala*.

**Keywords:** Arbuscular mycorrhizae, biofertilization, phosphorus, *Rhizophagus intraradices*.

### Resumen

**Introducción:** *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit es nativa de América tropical. El sistema radical de la especie se asocia a microorganismos que mejoran la nutrición y el crecimiento.

**Objetivo:** Evaluar el efecto de recolectas de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) sobre el contenido de fósforo (P) y crecimiento de *L. leucocephala* en vivero.

**Materiales y métodos:** Las semillas se sembraron y se aplicaron seis tratamientos: *Rhizophagus intraradices* (Schenck & Sm.) Walker & Schüßler (1), las recolectas “Caracoles” (2), “Rosario Izapa” (3), “Té limón” (4) y “San Rafael” (5), fertilización  $15_N-15_P-15_K$  (6) y un testigo. Las variables morfológicas y fisiológicas, colonización radical y contenido de P se registraron a los 120 días. Los datos se sometieron a un análisis de varianza y comparación de medias (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

**Resultados y discusión:** Los HMA mejoraron las características de la planta en comparación con el testigo y la fertilización. *Rhizophagus intraradices* causó los valores más altos de crecimiento en la parte aérea, colonización micorrízica y contenido de P, y el menor crecimiento en el sistema radical. Los aislamientos “Caracoles” y “Rosario Izapa” promovieron altura, biomasa de la raíz y contenido de P más altos que “Té limón” y “San Rafael”.

**Conclusión:** Los HMA permiten disminuir la fertilización química sin detrimento del crecimiento de *L. leucocephala*.

### Palabras clave:

Micorrizas arbusculares, biofertilización, fósforo, *Rhizophagus intraradices*.

## Introduction

*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit is distributed in the tropics and subtropics (Yeung, Wong, & Wong, 2002) and has great biological diversity in Mexico (Grether, Martínez-Bernal, Luckow, & Zárate, 2006). The plant is fast-growing (Tewari, Katiyar, Ram, & Misra, 2004) and is used in the reforestation of eroded areas and for other purposes in various production systems (Wencomo & Lugo, 2013).

The species *L. leucocephala* easily adapts to different environments, probably due to the ability of the root system to establish symbiosis with diverse microorganisms, if one takes into account that the vegetation can be linked to the development of the underground community (Sanon et al., 2009). Among them are arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), which influence the growth of plants through the transport of nutrients, especially phosphorus; in addition, they promote the absorption of minor elements (Smith, Anderson, & Smith, 2015), trigger defense mechanisms against pathogens (Jaizme-Vega & Rodríguez-Romero, 2008) and improve tolerance to adverse environmental conditions (Doubková, Vlasáková, & Sudová, 2013). AMF can be found in all terrestrial ecosystems; their universality implies vast taxonomic diversity (Jaizme-Vega, 2009). Native AMF populations have favored the sustainability of agricultural systems, while other introduced AMF may not adapt to the environment and present ecological specificity (Serralde & Ramírez 2004) or preference for the host (Daniell, Husband, Fitter, & Young, 2001). In the rhizosphere, in addition to microorganisms, there are abundant root exudates that have a selective effect on the soil microbiota (Offre et al., 2007).

The aim of the present study was to evaluate the effect of different collections of arbuscular mycorrhizal fungi from southeastern Mexico on the growth and phosphorus (P) content of *L. leucocephala*.

## Materials and methods

The research was carried out under nursery conditions during the spring of 2015 in the Experimental Field of the Faculty of Agricultural Sciences C-IV in Huehuetán, Chiapas. The nursery is located at coordinates 15° 00' NL and 94° 30' WL at 44 masl. The area has an Am(w'')ig climate, according to (1973). Mean annual rainfall is 2 326 mm and average annual temperature is 25.4 °C, according to García (1973).

The seed of *L. leucocephala* cv. Perú was harvested from a 10-year-old plantation in the Miguel Alemán neighborhood, municipality of Pijijiapan, Chiapas (15° 19' NL - 92° 33' WL). Four AMF isolates were collected

## Introducción

*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit se distribuye en el trópico y subtrópico (Yeung, Wong, & Wong, 2002) y tiene amplia diversidad biológica en México (Grether, Martínez-Bernal, Luckow, & Zárate, 2006). La planta es de crecimiento rápido (Tewari, Katiyar, Ram, & Misra, 2004); se utiliza en la reforestación de zonas erosionadas y con otros fines en diversos sistemas de producción (Wencomo & Lugo, 2013).

La especie *L. leucocephala* se adapta fácilmente a diferentes ambientes, debido probablemente a la capacidad del sistema radical para establecer simbiosis con diversos microorganismos, si se toma en cuenta que la vegetación puede vincularse con el desarrollo de la comunidad subterránea (Sanon et al., 2009). Entre ellos se encuentran los hongos micorrízicos arbusculares (HMA), los cuales influyen en el crecimiento de las plantas a través del transporte de nutrientes, especialmente fósforo; además, promueven la absorción de elementos menores (Smith, Anderson, & Smith, 2015), activan mecanismos de defensa contra patógenos (Jaizme-Vega & Rodríguez-Romero, 2008) y mejoran la tolerancia a condiciones ambientales adversas (Doubková, Vlasáková, & Sudová, 2013). En todos los ecosistemas terrestres pueden encontrarse HMA; su universalidad implica vasta diversidad taxonómica (Jaizme-Vega, 2009). Las poblaciones nativas de HMA han favorecido la sostenibilidad de los sistemas agrícolas, mientras que otros HMA introducidos pueden no adaptarse al ambiente y presentar especificidad ecológica (Serralde & Ramírez 2004) o preferencia por el hospedero (Daniell, Husband, Fitter, & Young, 2001). En la rizósfera, además de los microorganismos, hay abundantes exudados de las raíces que tienen efecto selectivo sobre la microbiota del suelo (Offre et al., 2007).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de diferentes recolectas de hongos micorrízicos arbusculares del sureste de México en el crecimiento y contenido de fósforo (P) de *L. leucocephala*.

## Materiales y métodos

La investigación se desarrolló en condiciones de vivero durante la primavera de 2015 en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Agrícolas C-IV en Huehuetán, Chiapas. El vivero se localiza en las coordenadas 15° 00' LN y 94° 30' LO a 44 m de altitud. El tipo climático, según García (1973), es Am(w'')ig. La precipitación media anual es de 2 326 mm y la temperatura media anual de 25.4 °C.

La semilla de *L. leucocephala* cv. Perú se cosechó de una plantación de 10 años de establecimiento en la colonia

in three tropical regions of Mexico. Two of them, “Caracoles” (Tenampulco, Puebla: 20° 08’ 30” NL and 97° 30’ 00” WL at 350 masl, 2 100 mm of precipitation and Regosol soils) and “San Rafael” (San Rafael, Veracruz: 20° 08’ 20” NL and 97° 02’ 57” WL at 20 masl, 1 600 mm of precipitation and Cambisol soils) were obtained from soil cultivated with *Vanilla planifolia* Andrews. The other two, “Rosario Izapa”, associated with *Theobroma cacao* L., and “Té limón”, associated with *Coffea arabica* L., were obtained in the Soconusco region of Chiapas (Tuxtla Chico, Chiapas: 14° 30’ NL and 92° 00’ WL at 425 masl, 4 252 mm of precipitation and Luvisol soils). These isolates were evaluated because their initial capacity to induce greater growth of the host plant during the multiplication stage has been observed. In addition to the above, *Rhizophagus intraradices* (Schenck & Sm.) Walker & Schüßler was evaluated, as a reference fungus, at a concentration of 40 spores·g<sup>-1</sup> of soil and 95 % root colonization in the host plant *Brachiaria brizantha* Hochst. ex A. Rich.) Stapf (Data contained in the Micorriza INIFAP® product. This AMF has been used in the biofertilizer induction program for various annual and perennial crops in Mexico (Aguirre-Medina, 2006).

In the roots collected, the presence of AMF was verified by staining and clearing (Phillips & Hayman, 1970). In each soil sample, the spores were separated into groups, by wet sieving and decanting, in order to multiply the similar fungi (Gerdemann & Nicolson, 1963), according to the color, shape and size observed in a stereomicroscope. Spores with similar characteristics were propagated for 90 days in a sterilized river sand substrate (in 1-L containers), using sorghum as a host plant. At harvest, at least 100 spores·g<sup>-1</sup> of soil with 93 % root colonization were achieved.

The substrate used in the research was obtained in the grounds of the same experimental field, at a depth of 0 to 30 cm in soils of the eutric Fluvisol group (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática [INEGI], 2005). The substrate was mixed with river sand previously washed and sieved at a ratio of 1:1 (v/v). The final substrate had the following components and characteristics: sand (82.7 %), silt (14.3 %), clay (4.16 %), sandy-loam texture, organic matter (2.8 %), pH 5.5, N (0.12 %), P (5.0 ppm), cation exchange capacity (CEC: 4.12 mg·100 g<sup>-1</sup>) and electrical conductivity (EC: 0.12 dS·m<sup>-1</sup>). Using this substrate, 5-kg bags were filled, perforated at the bottom to favor drainage and placed on iron terraces. Irrigation was carried out every other day.

The AMF were adhered to the *L. leucocephala* seeds with carboxymethylcellulose; the inoculum represented 6 % of the seed weight. The seeds were sown in pots, 3 cm deep, according to the following treatments: *R. intraradices*, “Caracoles”, “Rosario Izapa”, “Té limón”,

Miguel Alemán, municipio de Pijijiapan, Chiapas (15° 19’ LN - 92° 33’ LO). Cuatro aislamientos de HMA se recolectaron en tres regiones tropicales de México. Dos de ellos, “Caracoles” (Tenampulco, Puebla: 20° 08’ 30” LN y 97° 30’ 00” LO a 350 m de altitud, 2 100 mm de precipitación y suelos Regosoles) y “San Rafael” (San Rafael, Veracruz: 20° 08’ 20” LN y 97° 02’ 57” LO a 20 m, 1 600 mm de precipitación y suelos Cambisoles) se obtuvieron de suelo cultivado con *Vanilla planifolia* Andrews. Los otros dos, “Rosario Izapa”, asociado a *Theobroma cacao* L., y “Té limón” a *Coffea arabica* L. se obtuvieron en la región del Soconusco, Chiapas (Tuxtla Chico, Chiapas: 14° 30’ LN y 92° 00’ LO a 425 m, 4 252 mm de precipitación y suelos Luvisoles). Estos aislamientos se evaluaron debido a que se ha observado su capacidad inicial para inducir mayor crecimiento de la planta hospedante durante la etapa de multiplicación. Además de los anteriores, *Rhizophagus intraradices* (Schenck & Sm.) Walker & Schüßler se evaluó, como hongo de referencia, a una concentración de 40 esporas·g<sup>-1</sup> de suelo y 95 % de colonización de la raíz en la planta hospedante *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf (Datos contenidos en el producto Micorriza INIFAP®). Este HMA se ha utilizado en el programa de inducción de los biofertilizantes en diversos cultivos anuales y perennes en México (Aguirre-Medina, 2006).

En las raíces recolectadas se verificó la presencia de HMA mediante tinción y clareo (Phillips & Hayman, 1970). En cada muestra de suelo, las esporas se separaron en grupos, mediante tamizado húmedo y decantación, con el fin de multiplicar los hongos similares (Gerdemann & Nicolson, 1963), de acuerdo con el color, forma y tamaño observados en un estereomicroscopio. Las esporas con características similares se propagaron durante 90 días en un sustrato de arena de río esterilizado (en contenedores de 1 L), utilizando sorgo como planta hospedante. En la cosecha se lograron al menos 100 esporas·g<sup>-1</sup> de suelo con 93 % de colonización radical.

El sustrato utilizado en la investigación se obtuvo en los terrenos del mismo campo experimental, a una profundidad de 0 a 30 cm en suelos del grupo Fluvisol eútrico (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática [INEGI], 2005). El sustrato se mezcló con arena de río lavada previamente y tamizada en proporción 1:1 (v/v). El sustrato final tuvo los siguientes componentes y características: arena (82.7 %), limo (14.3 %), arcilla (4.16 %), textura arena migajonosa, materia orgánica (2.8 %), pH 5.5, N (0.12 %), P (5.0 ppm), capacidad de intercambio catiónico (CIC: 4.12 mg·100 g<sup>-1</sup>) y conductividad eléctrica (CE: 0.12 dS·m<sup>-1</sup>). Utilizando este sustrato, se llenaron bolsas con capacidad de 5 kg, se perforaron en la parte inferior para favorecer el drenaje y se colocaron sobre bancales de hierro. El riego se realizó cada tercer día.

“San Rafael”, fertilization with  $15_N-15_P-15_K$  and a control. The treatments were distributed in a completely randomized design with four repetitions.

The morphological variables (plant height, stem diameter, number of leaves and root colonization) and physiological variables (dry biomass of the root, stem and leaf) were recorded at 120 days after sowing (das). The height was obtained with a tape measure, from the root crown to the apical bud, and stem diameter was measured with a digital Vernier caliper (AutoTEC™, China), 5 cm away from the root crown to the apex. Mycorrhizal colonization (%) was determined in 100 root segments per treatment, with a length of 1.5 to 1.6 cm; they were prepared using the staining and clearing technique of Phillips and Hayman (1970) and were observed under a microscope with oil immersion objective (100x). On the other hand, the dry matter of the aerial and radical part was determined in a forced-air oven at temperatures of 75 to 80 °C for 72 h; subsequently, each component was weighed (Ohaus, Adventurer Pro, USA). With these variables, the quality index proposed by Dickson, Leaf, and Hosner (1960) was determined. Finally, the P content was quantified in a spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Model 400 ¼, USA).

The effects between treatments were determined through an analysis of variance for each variable with the PROC ANOVA procedure. Subsequently, Tukey's range test ( $P \leq 0.05$ ) was performed using SAS computer software version 8.1 (Statistical Analysis System [SAS], 1999-2000).

## Results and discussion

Table 1 shows the growth variables of *L. leucocephala* plants with the treatments applied. Plant height was statistically different among them ( $P \leq 0.05$ ); the maximum was 128 cm with the “Caracoles” collection and the increases were 15 % (19 cm) in relation to the control and 8.6 % (16 cm) compared to the fertilized treatment. The “Caracoles”, “Rosario Izapa” and “Té limón” isolates were statistically similar with *R. intraradices*, with an average height of  $124 \pm 1.9$  cm. In other perennial species such as *T. cacao*, Aguirre-Medina, Mendoza-López, Cadena-Iñiguez, and Avendaño-Arrazate (2007) report 9 cm more height in plants inoculated with *R. intraradices* compared to the control at 120 das.

In the case of stem diameter, the plants inoculated with *R. intraradices* were 25 % higher ( $P \leq 0.05$ ) than those of the control and fertilized treatment, and 21 % higher than those inoculated with the AMF collected. In other plants inoculated with *R. intraradices* such as *Cedrela odorata* L. and *Coffea canephora* (Pierre) ex Froehner, the increase was 8 and 20 %, respectively, with respect to the control

Los HMA fueron adheridos a las semillas de *L. leucocephala* con carboximetilcelulosa; el inóculo representó 6 % del peso de la semilla. Estas se sembraron en macetas, a 3 cm de profundidad, de acuerdo con los siguientes tratamientos: *R. intraradices*, “Caracoles”, “Rosario Izapa”, “Té limón”, “San Rafael”, fertilización con  $15_N-15_P-15_K$  y un testigo. Los tratamientos se distribuyeron en un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones.

Las variables morfológicas (altura de planta, diámetro del tallo, número de hojas y colonización radical) y fisiológicas (biomasa seca de la raíz, tallo y hoja) se registraron a los 120 días después de la siembra (dds). La altura se obtuvo con cinta métrica, a partir de la corona radical hasta la yema apical, y el diámetro del tallo se midió con vernier digital (AutoTEC™, China), a 5 cm de distancia de la corona radical hacia el ápice. La colonización micorrízica (%) se determinó en 100 segmentos de raíz, de cada tratamiento, con longitud de 1.5 a 1.6 cm; se prepararon mediante la técnica de tinción y aclareo de Phillips y Hayman (1970) y se observaron al microscopio con objetivo de inmersión (100x). Por otra parte, la materia seca de la parte aérea y radical se determinó en estufa de aire forzado a temperaturas de 75 a 80 °C por 72 h; posteriormente, se pesó cada componente (Ohaus, Adventurer Pro, USA). Con estas variables se determinó el índice de calidad propuesto por Dickson, Leaf, y Hosner (1960). Finalmente, el contenido de P se cuantificó en un espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific Modelo 400 ¼, USA).

Los efectos entre tratamientos se determinaron a través de un análisis de varianza para cada variable con el procedimiento PROC ANOVA. Posteriormente se hizo una comparación de medias (Tukey,  $P \leq 0.05$ ) utilizando el programa computacional SAS versión 8.1 (Statistical Analysis System [SAS], 1999-2000).

## Resultados y discusión

El Cuadro 1 muestra las variables de crecimiento de las plantas de *L. leucocephala* con los tratamientos aplicados. La altura de la planta fue estadísticamente diferente entre estos ( $P \leq 0.05$ ); la máxima fue de 128 cm con la recolecta “Caracoles” y los incrementos fueron de 15 % (19 cm) con relación al testigo y 8.6 % (16 cm) en comparación con el tratamiento fertilizado. Los aislamientos “Caracoles”, “Rosario Izapa” y “Té limón” fueron estadísticamente similares con *R. intraradices*, con un promedio de altura de  $124 \pm 1.9$  cm. En otras especies perennes como *T. cacao*, Aguirre-Medina, Mendoza-López, Cadena-Iñiguez, y Avendaño-Arrazate (2007) reportan 9 cm más de altura en las plantas inoculadas con *R. intraradices* en comparación con el testigo a los 120 dds.

(Aguirre-Medina, Mina-Briones, Cadena-Iñiguez, Dardón-Zunun, & Hernández-Sedas, 2014; Ibarra-Puón, Aguirre-Medina, Ley-De Coss, Cadena-Iñiguez, & Zavala-Mata, 2014). With other AMF such as *Glomus fasciculatum* (Thaxter) Gerdemann & Trappe inoculated in *Tectona grandis* L. F. and *Astronium graveolens* Jacq., the increase in stem diameter was 11.8 % compared to the control (Hernández & Salas, 2009).

Regarding the number of leaves, *R. intraradices* induced 18 more leaves than the control and fertilized treatment, and 14 more than the AMF collected ( $P \leq 0.05$ ). On average, the isolates induced two leaves more than the control and the treatment with chemical fertilization. In *T. cacao* inoculated with *R. intraradices*, the plants had four more leaves than the control (Aguirre-Medina et al., 2007), and the *C. canephora* plants had two more leaves with the same endomycorrhizal fungus in soil-sand as a substrate (Ibarra-Puón et al., 2014). The number of leaves increased in mycorrhized plants, with the exception of “Té limón”, possibly due to the greater nutrient absorption capacity (Leigh, Hodge, & Fitter, 2009), which induces increased photosynthetic activity after colonization, as in the case of bean (Aguirre-Medina, Kohashi-Shibata, Trejo-López, Acosta Gallegos, & Cadena-Iñiguez, 2005).

En el caso del diámetro del tallo, las plantas inoculadas con *R. intraradices* fueron 25 % mayores ( $P \leq 0.05$ ) que las del testigo y el tratamiento fertilizado, y 21 % mayores que las inoculadas con los HMA recolectados. En otras plantas inoculadas con *R. intraradices* como *Cedrela odorata* L. y *Coffea canephora* (Pierre) ex Froehner, el incremento fue 8 y 20 %, respectivamente, con respecto al testigo (Aguirre-Medina, Mina-Briones, Cadena-Iñiguez, Dardón-Zunun, & Hernández-Sedas, 2014; Ibarra-Puón, Aguirre-Medina, Ley-De Coss, Cadena-Iñiguez, & Zavala-Mata, 2014). Con otros HMA como *Glomus fasciculatum* (Thaxter) Gerdemann & Trappe inoculado en *Tectona grandis* L. F. y *Astronium graveolens* Jacq., el incremento del diámetro del tallo fue 11.8 % en comparación con el testigo (Hernández & Salas, 2009).

Con relación al número de hojas, *R. intraradices* indujo 18 hojas más en comparación con el testigo y el tratamiento fertilizado, y 14 más que los HMA recolectados ( $P \leq 0.05$ ). En promedio, los aislamientos indujeron dos hojas más que el testigo y el tratamiento con fertilización química. En *T. cacao* inoculado con *R. intraradices*, las plantas tuvieron cuatro hojas más en comparación con el testigo (Aguirre-Medina et al., 2007), y las plantas de *C. canephora* tuvieron dos hojas más con el mismo hongo endomicorrízico en suelo-arena como

**Table 1. Morphological and physiological components of *Leucaena leucocephala* inoculated with different arbuscular mycorrhizal fungi in the nursery. Results at 120 days after sowing.**

**Cuadro 1. Componentes morfológicos y fisiológicos de *Leucaena leucocephala* inoculada con diferentes hongos micorrízicos arbusculares en vivero. Resultados a los 120 días después de la siembra.**

Treatment/ Tratamiento	Height (cm)/ Altura (cm)	Diameter (mm)/ Diámetro (mm)	Number of leaves/ Número de hojas	Dry weight (g·plant <sup>-1</sup> )/Peso seco (g·planta <sup>-1</sup> )			DQI/ ICD
				Leaves/ Hojas	Stem/ Tallo	Root/ Raíz	
<i>Rhizophagus intraradices</i>	123 ± 1.3 ab	9.1 ± 0.0 a	37 ± 0.8 a	16.08 ± 0.5 a	15.76 ± 0.5 a	10.49 ± 0.5 c	2.27
Caracoles	128 ± 2.7 a	7.3 ± 0.4 b	24 ± 0.9 b	10.19 ± 0.3 b	12.42 ± 0.6 b	13.95 ± 0.7 ab	1.80
Rosario Izapa	126 ± 3.2 ab	7.3 ± 0.2 b	21 ± 0.8 bc	14.17 ± 0.4 a	11.32 ± 0.6 bc	14.64 ± 0.6 a	1.87
Té limón	119 ± 3.3 abc	7.0 ± 0.1 b	18 ± 0.4 c	9.05 ± 0.7 bc	9.86 ± 0.1 bcd	11.87 ± 0.2 bc	1.68
San Rafael	86 ± 2.2 d	7.0 ± 0.2 b	24 ± 1.4 b	8.00 ± 0.3 bc	7.89 ± 0.9 d	9.99 ± 0.5 c	2.08
15 <sub>N</sub> -15 <sub>P</sub> -15 <sub>K</sub>	112 ± 4.3 bc	6.7 ± 0.1 b	19 ± 1.1 c	8.56 ± 0.6 bc	8.98 ± 0.3 cd	12.60 ± 0.9 abc	1.57
Control/ Testigo	109 ± 3.6 c	6.8 ± 0.1 b	19 ± 0.5 c	7.80 ± 0.3 c	8.48 ± 0.4 d	12.31 ± 0.3 abc	1.56
CV (%)	5.4	7.5	8.0	9.6	9.3	9.7	

CV: coefficient of variation. DQI: Dickson quality index. Values with the same letter within each column are equal according to the Tukey test ( $P \leq 0.05$ ).

CV: coeficiente de variación. ICD: índice de calidad de Dickson. Valores con la misma letra dentro de cada columna son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

Leaf biomass production showed statistical difference ( $P \leq 0.05$ ) among treatments and the highest increase was recorded with the inoculation of the reference AMF *R. intraradices*. Among the fungi collected, “Rosario Izapa” decreased the dry matter allocation to the leaves by 11 % compared to *R. intraradices*, although statistically they were similar; however, the decrease was greater in the other isolates, on the order of 36 and 46 % for “Caracoles” and “Té limón”, respectively, and 46 % for “San Rafael” and the fertilized control. The results indicate that the accumulation of dry matter in the biomass of the leaf varies according to the isolate applied. Moora, Öpik, Sen, and Zobel (2004) point out variations in mycorrhization, nutrient uptake and plant productivity based on the interaction between plant species and AMF.

Stem dry weight also increased with *R. intraradices* and was statistically superior ( $P \leq 0.05$ ) to the rest of the treatments. Among the isolates collected, a differential response was presented. “Caracoles” and “Rosario Izapa” allocated 24 % less biomass to the stem compared to *R. intraradices*, while in “Té limón”, “San Rafael”, the control and the fertilized treatment, the decrease was 43 %. Doubková et al. (2013) showed that inoculation with AMF, in species of agricultural interest, increases the nutrition and growth of the plant, and allows it to overcome situations of biotic and abiotic stress. This background suggests the contrasting functionality of microorganisms in interaction with plants (Jäderlund, Arthurson, Granhall, & Jansson, 2008), as in the response found with *L. leucocephala*.

With regard to root biomass, there was a differential response among the isolates; the largest increase was recorded in “Caracoles” and “Rosario Izapa”. In relation to these two treatments, the biomass decreased 28 % in *R. intraradices* and “San Rafael”, and 15 % in the control and fertilized treatments. In *C. arabica*, *R. intraradices* induced lower root biomass compared to the control (Aguirre-Medina et al., 2011), but in *C. odorata* it increased (Aguirre-Medina et al., 2014). The decrease in the root biomass seems to be replaced by the hyphae of the fungus (Azcón & Barea, 1980); otherwise, it would be expected that treatments with a greater root system, such as those inoculated with the native and control collections, would have higher absorption of soil nutrients, but in this case the opposite happened with P, as observed in Figure 1.

The root-shoot ratio of *L. leucocephala* was modified with the biofertilization of some AMF under nursery conditions (Figure 1). The root system of *L. leucocephala* inoculated with *R. intraradices* represented 28.4 % of the total biomass, being the lowest percentage compared to the rest of the treatments (between 35 and 37 %). By contrast, in the case of aerial biomass, *R. intraradices*

sustrato (Ibarra-Puón et al., 2014). El número de hojas incrementó en las plantas micorrizadas, con excepción de “Té limón”, debido posiblemente a la mayor capacidad de absorción de nutrientes (Leigh, Hodge, & Fitter, 2009), lo cual induce aumento de la actividad fotosintética después de la colonización, como en el caso del frijol (Aguirre-Medina, Kohashi-Shibata, Trejo-López, Acosta Gallegos, & Cadena-Iñiguez, 2005).

La producción de biomasa de la hoja presentó diferencia estadística ( $P \leq 0.05$ ) entre los tratamientos y el mayor incremento se registró con la inoculación del HMA de referencia *R. intraradices*. Entre los hongos recolectados, “Rosario Izapa” disminuyó 11 % la asignación de materia seca a las hojas en comparación con *R. intraradices*, aunque estadísticamente fueron similares; sin embargo, la disminución fue mayor en los otros aislamientos, del orden de 36 y 46 % para “Caracoles” y “Té limón”, respectivamente, y 46 % para “San Rafael” y el testigo fertilizado. Los resultados indican que la acumulación de materia seca en la biomasa de la hoja varía según el aislamiento aplicado. Moora, Öpik, Sen, y Zobel (2004) señalan variaciones en la micorrización, la captación de nutrientes y la productividad vegetal en función de la interacción entre especies de plantas y los HMA.

El peso seco del tallo también incrementó con *R. intraradices* y fue estadísticamente superior ( $P \leq 0.05$ ) al resto de los tratamientos. Entre los aislamientos recolectados se presentó respuesta diferencial. “Caracoles” y “Rosario Izapa” asignaron 24 % menos biomasa al tallo en comparación con *R. intraradices*, mientras que en “Té limón”, “San Rafael”, el testigo y el tratamiento fertilizado, la disminución fue de 43 %. Doubková et al. (2013) demostraron que la inoculación con HMA, en especies de interés agrícola, incrementa la nutrición y el crecimiento de la planta, y permite superar situaciones de estrés biótico y abiótico. Estos antecedentes sugieren la funcionalidad contrastante de los microorganismos en interacción con las plantas (Jäderlund, Arthurson, Granhall, & Jansson, 2008), como la respuesta encontrada con *L. leucocephala*.

Con respecto a la biomasa de la raíz hubo respuesta diferencial entre los aislamientos; el mayor incremento se registró en “Caracoles” y “Rosario Izapa”. Con relación a estos dos tratamientos, la biomasa disminuyó 28 % en *R. intraradices* y “San Rafael”, y 15 % en los tratamientos testigo y fertilizado. En *C. arabica*, *R. intraradices* indujo menor biomasa radical comparado con el testigo (Aguirre-Medina et al., 2011), pero en *C. odorata* incrementó (Aguirre-Medina et al., 2014). La disminución de la biomasa radical parece que es sustituida por la hifa del hongo (Azcón & Barea, 1980); de lo contrario, se esperaría que los tratamientos con mayor sistema radical, como los inoculados con las

accounted for 71.6 %. In the rest of the treatments, the value fluctuated from 63 to 65 %. The above effect influences the determination of the plant quality index proposed by Dickson et al. (1960).

Kanno et al. (2006) evaluated native isolates of endomycorrhizal fungi in Brazil and found increases in aerial and root biomass in *Brachiaria decumbens* Stapf, *B. brizantha* and *Panicum maximum* Jacq., but not in *B. humidicola* (Rendle) Schweick.

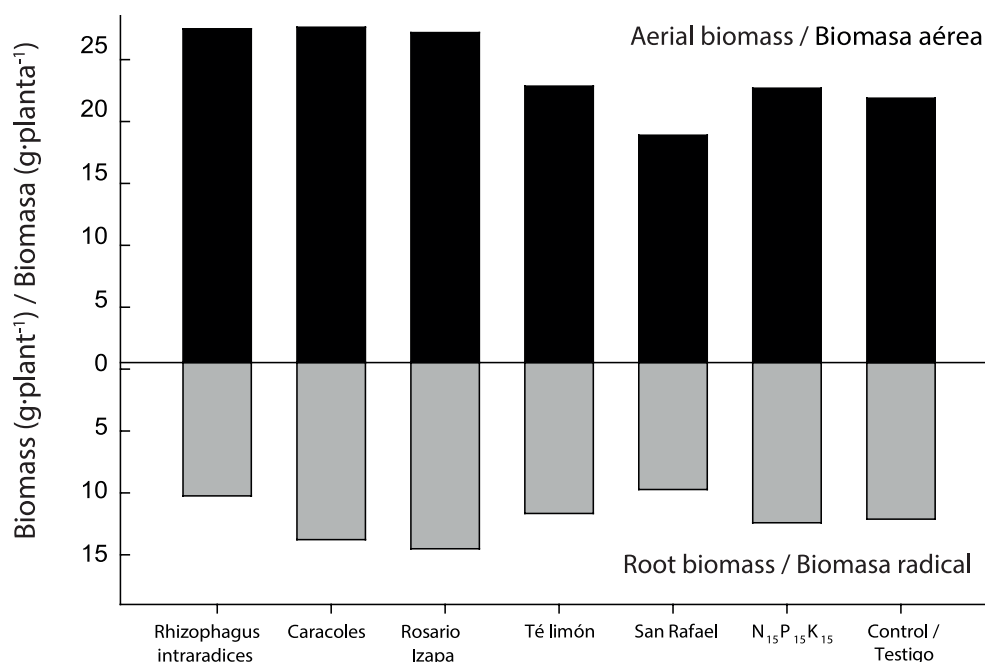
With respect to root colonization, the highest value was obtained with *R. intraradices* (78 %), while the lowest (61 %) was found in the control. This confirms the presence of other mycorrhizal fungi in the substrate used, but with less ability to stimulate the growth of *Leucaena*. These results confirm the colonization capacity of *R. intraradices*, as has also happened in other annual and perennial crops (Aguirre-Medina, Aguirre-Cadena, Cadena-Iñiguez, & Avendaño-Arrazate, 2012). As for the collections, the average colonization was: Caracoles (68 %), Rosario Izapa (72 %), Té limón (77 %) and San Rafael (63 %). These fungi, when introduced adhered to the seed, have a greater chance of colonization when the radicle emerges, unlike the fungi that are present in the substrate but may not be in the same vicinity. It is likely that colonization by native fungi occurs, but its effect is assumed in the ability to influence the growth of the host plant and the transport of P.

colectas nativas y el testigo, tuvieron mayor absorción de nutrientes del suelo, pero en este caso sucedió lo contrario con el P, tal como se observa en la Figura 1.

La relación raíz-vástago de *L. leucocephala* se modificó con la biofertilización de algunos HMA en condiciones de vivero (Figura 1). El sistema radical de *L. leucocephala* inoculado con *R. intraradices* representó 28.4 % del total de la biomasa, siendo el menor porcentaje en comparación con el resto de los tratamientos (entre 35 y 37 %). En cambio, en el caso de la biomasa aérea, *R. intraradices* representó 71.6 %. En el resto de los tratamientos, el valor fluctuó de 63 a 65 %. El efecto anterior influye en la determinación del índice de calidad de planta propuesto por Dickson et al. (1960).

Kanno et al. (2006) evaluaron aislamientos nativos de hongos endomicorrízicos en Brasil y encontraron incrementos en biomasa aérea y radical en *Brachiaria decumbens* Stapf, *B. brizantha* y *Panicum maximum* Jacq. pero no en *B. humidicola* (Rendle) Schweick.

Con respecto a la colonización radical, el valor más alto se obtuvo con *R. intraradices* (78%), mientras que el menor (61%) se encontró en el testigo. Lo anterior confirma la presencia de otros hongos micorrízicos en el sustrato utilizado, pero con menor capacidad de estimular el crecimiento de *Leucaena*. Estos resultados confirman la capacidad de colonización de *R. intraradices*, como ha sucedido también en otros cultivos

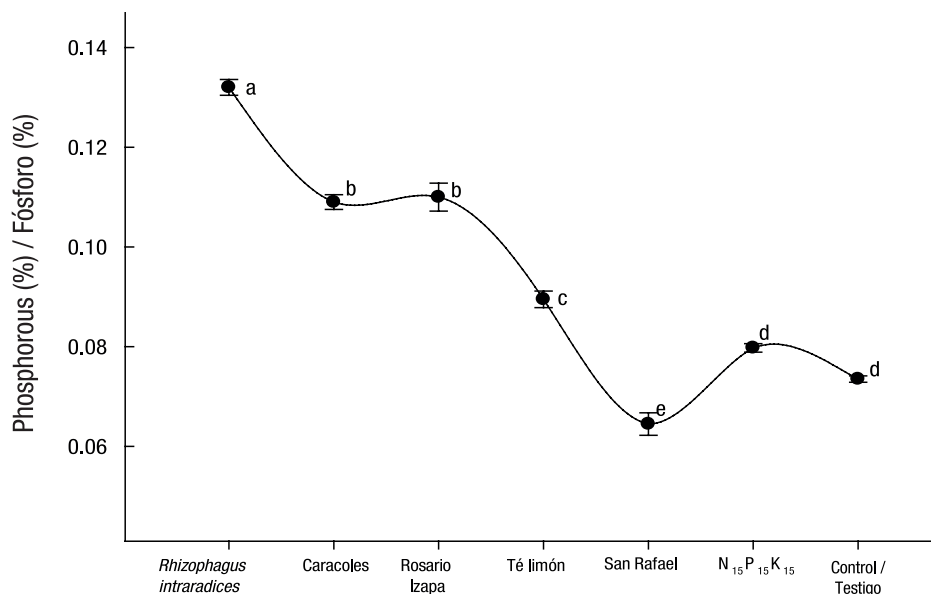


**Figure 1. Aerial/root biomass ratio of *Leucaena leucocephala* inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. The values are averages of four repetitions per treatment.**

**Figura 1. Relación biomasa aérea/radical de *Leucaena leucocephala* inoculada con hongos micorrízicos arbusculares. Los valores son promedios de cuatro repeticiones por tratamiento.**

Figure 2 shows that the P content in *L. leucocephala* was statistically higher ( $P \leq 0.05$ ) in the treatment with *R. intraradices*. Plants in symbiosis with mycorrhizal fungi absorb P from the soil more efficiently than non-colonized plants (Aguirre-Medina et al., 2011; Kanno et al., 2006). Based on the results, AMF inoculated in *L. leucocephala* allow decreasing chemical fertilization in the nursery, without detriment to plant growth.

anuales y perennes (Aguirre-Medina, Aguirre-Cadena, Cadena-Iñiguez, & Avendaño-Arrazate, 2012). En cuanto a las recolectas, la colonización promedio fue: Caracoles (68%), Rosario Izapa (72%), Té limón (77%) y San Rafael (63%). Estos hongos, al introducirse adheridos a la semilla, tienen mayor oportunidad de colonización cuando la radícula emerge, a diferencia de los hongos que están presentes en el sustrato pero que pueden no estar en la misma cercanía.



**Figure 2.** Variation in phosphorus content in the plant tissue of *Leucaena leucocephala* inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. Results at 120 days after sowing. Different letters indicate statistically significant differences according to the Tukey test ( $P \leq 0.05$ ). The vertical bars indicate the standard error of the mean ( $n = 4$ ). Coefficient of variation = 3.7 %.

**Figura 2.** Variación del contenido de fósforo en el tejido vegetal de *Leucaena leucocephala* inoculada con hongos micorrízicos arbusculares. Resultados a los 120 días después de la siembra. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). Las barras verticales indican el error estándar de la media ( $n = 4$ ). Coeficiente de variación = 3.7 %.

## Conclusions

The morphological and physiological performance components of *Leucaena leucocephala* were modified in interaction with the isolates collected, but they maintained a similar proportion in the shoot-root ratio. Biofertilization with *Rhizophagus intraradices* promoted greater plant growth of *L. leucocephala* in the aerial part, lower in the root system and higher phosphorus content. With regard to endomycorrhizal fungi, “Caracoles”, “Rosario Izapa” and “Té limón” increased the P content in the plant tissue compared to the control and fertilized treatment. The “Caracoles” and “Rosario Izapa” collections are good candidates as biofertilizers in perennial species. Based on the results obtained, AMF in *L. leucocephala* can help reduce chemical fertilization in the nursery, without detriment to plant growth.

*Enf of English version*

Es probable que la colonización por hongos nativos suceda, pero su efecto se asume en la capacidad para influir en el crecimiento de la planta hospedante y el transporte de P.

En la Figura 2 se observa que el contenido de P en *L. leucocephala* fue estadísticamente mayor ( $P \leq 0.05$ ) en el tratamiento con *R. intraradices*. Las plantas en simbiosis con hongos micorrízicos absorben P del suelo de manera más eficiente que las plantas no colonizadas (Aguirre-Medina et al., 2011; Kanno et al., 2006). De acuerdo con los resultados obtenidos, los HMA inoculados en *L. leucocephala* permiten disminuir la fertilización química en vivero, sin detrimento del crecimiento de la planta.

## Conclusiones

Los componentes morfológicos y fisiológicos del rendimiento en *Leucaena leucocephala* se modificaron en interacción con los aislamientos recolectados, pero



## References / Referencias

- Aguirre-Medina, J. F. (2006). *Biofertilizantes microbianos: Experiencias agronómicas del programa nacional del INIFAP en México*. México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias - Centro de Investigaciones Regionales Pacífico Sur - Campo Experimental Rosario Izapa. Retrieved from <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/handle/123456789/3633>
- Aguirre-Medina, J. F., Aguirre-Cadena, J. F., Cadena-Iñiguez, J., & Avendaño-Arrazate, C. H. (2012). *Biofertilización en plantas de la selva húmeda tropical* (1.ª ed.). México: Colegio de Postgraduados.
- Aguirre-Medina, J. F., Kohashi-Shibata, J., Trejo-López, C., Acosta Gallegos, J. A., & Cadena-Iñiguez, J. (2005). Inoculación de *Phaseolus vulgaris* L. con tres microorganismos y su efecto en tolerancia a sequía. *Agricultura Técnica en México*, 31, 125–137. Retrieved from <http://www.redalyc.org/toc.oa?id=608&numero=10078>
- Aguirre-Medina, J. F., Mendoza-López, A., Cadena-Iñiguez, J., & Avendaño-Arrazate, C. H. (2007). La biofertilización del cacao (*Theobroma cacao* L.) en vivero con *Azospirillum brasilense* Tarrand, Krieg et Döbereiner y *Glomus intraradices* Schenk et Smith. *Interciencia*, 32(8), 1–6. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33932808>
- Aguirre-Medina, J. F., Mina-Briones, F., Cadena-Iñiguez, O. J., Dardón-Zunun, J. D., & Hernández-Sedas, D. A. (2014). Crecimiento de *Cedrela odorata* L. biofertilizada con *Rhizophagus intraradices* y *Azospirillum brasilense* en vivero. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 20(3), 177–186. doi: 10.5154/r.rchscfa.2014.01.001
- Aguirre-Medina, J. F., Moroyoqui-Ovilla, D. M., Mendoza-López, A., Cadena-Iñiguez, J., Avendaño-Arrazate, C. H., & Aguirre-Cadena, J. F. (2011). Aplicación de *A. brasilense* y *G. intraradices* a *Coffea arabica* en vivero. *Agronomía Mesoamericana*, 22(1), 1–10. Retrieved from [http://www.mag.go.cr/rev\\_meso/v22n01\\_071.pdf](http://www.mag.go.cr/rev_meso/v22n01_071.pdf)
- Azcón, G. C., & Barea, J. M. (1980). Micorrizas. *Investigación y Ciencia*, 47, 8–16.
- Daniell, T., Husband, J. R., Fitter, A. H., & Young, J. P. W. (2001). Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing arable crops. *FEMS Microbiology Ecology* 36(2-3), 203–209. doi: 10.1111/j.1574-6941.2001.tb00841.x
- Dickson, A., Leaf, A. L., & Hosner, J. F. (1960). Quality appraisal of white spruce and white pine seedling stock in nurseries. *Forestry Chronicle*, 36, 10–13. Retrieved from <http://pubs.cif-ifc.org/doi/pdf/10.5558/tfc36010-1>
- Doubková, P., Vlasáková, E., & Sudová, R. (2013). Arbuscular mycorrhizal symbiosis alleviates drought stress imposed on *Knautia arvensis* plants in serpentine soil. *Plant Soil*, 370, 149–161. doi: 10.1007/s11104-013-1610-7
- García, A. E. (1973). *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen para adaptarlas a las condiciones* mantuvieron proporción semejante en la relación vástago-raíz. La biofertilización con *Rhizophagus intraradices* promovió mayor crecimiento vegetal de *L. leucocephala* en la parte aérea, menor en el sistema radical y mayor contenido de fósforo. Con respecto a los hongos endomicorrízicos, “Caracoles”, “Rosario Izapa” y “Té limón” incrementaron el contenido de P en el tejido vegetal en comparación con el testigo y el tratamiento fertilizado. Las recolectas “Caracoles” y “Rosario Izapa” son buenos candidatos como biofertilizantes en las especies perennes. De acuerdo con los resultados obtenidos, los HMA en *L. leucocephala* permiten disminuir la fertilización química en vivero, sin detrimento del crecimiento de la planta.
- Fin de la versión en español*
- 
- de la república mexicana (3a ed.). México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gerdemann, J. W., & Nicolson, T. H. (1963). Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from the soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*, 46(2), 235–244. doi: 10.1016/S0007-1536(63)80079-0
- Grether, R., Martínez-Bernal, A., Luckow, M., & Zárate, S. (2006). Fascículo 44, Mimosaceae. In A. Novelo-Retana, R. Medina-Lemos, H. Ochoterena-Booth, G. A. Salazar-Chávez, & L. O. Alvarado-Cárdenas (Eds.), *Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán* (1.ª ed., pp. 1–108). México: UNAM. Retrieved from <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/mimosaceae/leucaena-leucocephala/fichas/ficha.htm>
- Hernández, W., & Salas, E. (2009). La inoculación con *Glomus fasciculatum* en el crecimiento de cuatro especies forestales en vivero y campo. *Agronomía Costarricense*, 33(1), 17–30. Retrieved from <http://www.latindex.ucr.ac.cr/agrocostar-33-1/agrocostar-33-1-02.pdf>
- Ibarra-Puón, J. C., Aguirre-Medina, J. F., Ley-De Coss, A., Cadena-Iñiguez, J., & Zavala-Mata, A. (2014). Inoculación de *Coffea canephora* (Pierre) ex Froehner con *Rhizophagus intraradices* (Schenck et Sm.) Walker et Schuessler y *Azospirillum brasilense* Tarrand, Krieg et Döbereiner en vivero. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 20(2), 201–213. doi: 10.5154/r.rchsh.2013.09.027
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). (2005). Marco geoestadístico municipal, versión 3.1. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Retrieved from <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/datos-geograficos/21/21158.pdf>
- Jäderlund, L., Arthurson, V., Granhall, U., & Jansson, J. K. (2008). Specific interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting bacteria: as revealed by different combinations. *FEMS*

- Microbiol Letters*, 287(2),174–180. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01318.x
- Jaizme-Vega, M. C. (2009). Las micorrizas. Una simbiosis de interés para la agricultura. *Revista Vida Rural*, 288, 40–52. Retrieved from [http://www.mapama.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf\\_Vrural%2FVrural\\_2009\\_288\\_48\\_52.pdf](http://www.mapama.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf_Vrural%2FVrural_2009_288_48_52.pdf)
- Jaizme-Vega, M. C., & Rodríguez-Romero, A. S. (2008). Integración de microorganismos benéficos (Hongos micorrícicos y bacterias rizosféricas) en agrosistemas de las Islas Canarias. *Agroecología*, 3, 33–39. Retrieved from <http://revistas.um.es/agroecologia/article/view/95491/91801>
- Kanno, T., Saito, M., Ando, Y., Macedo, M. C. M., Nakamura, T., & Miranda, C. H. B. (2006). Importance of indigenous arbuscular mycorrhiza for growth and phosphorus uptake in tropical forage grasses growing on an acid, infertile soil from the Brazilian savannas. *Tropical Grasslands*, 40, 94–101. Retrieved from [http://www.tropicalgrasslands.info/public/journals/4/Historic/Tropical%20Grasslands%20Journal%20archive/PDFs/Vol\\_40\\_2006/Vol\\_40\\_02\\_20](http://www.tropicalgrasslands.info/public/journals/4/Historic/Tropical%20Grasslands%20Journal%20archive/PDFs/Vol_40_2006/Vol_40_02_20)
- Leigh, J., Hodge, A., & Fitter, A. H. (2009). Arbuscular mycorrhizal fungi can transfer substantial amounts of nitrogen to their host plant from organic material. *New Phytologist*, 181, 199–207. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02630.x
- Moora, M., Öpik, M., Sen, R., & Zobel, M. (2004). Native arbuscular mycorrhizal fungal communities differentially influence the seedling performance of rare and common *Pulsatilla* species. *Functional Ecology*, 18(4), 554–562. doi: 10.1111/j.0269-8463.2004.00876.x
- Offre, P., Pivato, B., Siblot, S., Gamalero, E., Corberand, T., Lemanceau, P., & Mougél, C. (2007). Identification of bacterial groups preferentially associated with mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 913–921. doi: 10.1128/AEM.02042-06
- Phillips, J. M., & Hayman, D. J. (1970). Improved procedures for clearing and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55, 158–161. doi: 10.1016/S0007-1536(70)80110-3
- Sanon, A., Andrianjaka, Z. N., Prin Y., Bally R., Thioulouse J., Comte, G., & Duponnois, R. (2009). Rhizosphere microbiota interfere with plant-plant interactions. *Plant Soil*, 321, 259–278. doi: 10.1007/s11104-009-0010-5
- Serralde, O. A. M., & Ramírez, G. M. M. (2004). Análisis de poblaciones de micorrizas en maíz *Zea mays* cultivado en suelos ácidos bajo diferentes tratamientos agronómicos. *Revista Corpoica*, 5(1), 31–40. Retrieved from <http://corpomail.corpoica.org.co/BACFILES/BACDIGITAL/48629/48629.pdf>
- Smith, S., Anderson, I., & Smith, F. (2015). Mycorrhizal associations and phosphorus acquisition: From cells to ecosystems. In W. C. Plaxton, & H. Lambers (Eds.), *Annual plant reviews volume 48: Phosphorus metabolism in plants* (pp. 409–440). USA: John Wiley & Sons. doi: 10.1002/9781118958841.ch14
- Statistical Analysis System (SAS). (1999-2000). SAS/STAT user's Guide: version 8.1. Cary NC, USA: Author.
- Tewari, S. K., Katiyar, R. S., Ram, B., & Misra, P. N. (2004). Effect of age and season of harvesting on the growth, coppicing characteristics and biomass productivity of *Leucaena leucocephala* and *Vitex negundo*. *Biomass and Bioenergy*, 26, 229–234. doi: 10.1016/S0961-9534(03)00118-1
- Wencomo, H. B., & Lugo, J. (2013). Rendimiento de materia seca y otros componentes en *Leucaena leucocephala* cv. Cunningham con el uso del Liplant. *Pastos y Forrajes*, 36(1), 43–49. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=269127587004>
- Yeung, P. K. K., Wong, F. T. W., & Wong, J. T. Y. (2002). Mimosine the allelochemical from the leguminous tree *L. leucocephala*, selectively enhances cell proliferation in dinoflagellates. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 5160–5163. doi: 10.1128/AEM.68.10.5160-5163.2002